

内蒙古中东部草原区克氏针茅种群 遗传分化的 RAPD 研究

赵念席, 高玉葆*, 王金龙, 陈磊, 阮维斌, 任安芝, 刘惠芬

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘要:采用 RAPD-PCR 技术对内蒙古中东部草原分布的 7 个克氏针茅(*Stipa krylovii* Roshev.)种群进行了分析。从 100 个 10 碱基随机引物中筛选出 21 个有效引物,共扩增出 229 条稳定的 DNA 带,其中 171 条带具有多态性,多态性百分比(PPB)为 74.67%。将每个扩增产物看作一个独立的性状,按其有无列出二元数据矩阵,计算 Jaccard、简单匹配系数(SM)和 Dice 遗传相似性系数,通过 UPGMA 法构建分子标记聚类图;并通过主成分分析(PCA)和主轴法分析(PAF),将 7 个种群分类;统计各个种群特异性 DNA 带,计算占总扩增条带的百分数。结果表明:(1)不同地理种群之间扩增结果差异明显,具有丰富的遗传多样性;(2)不同地理种群间存在一定程度的分化,这种分化是与种群之间的实际距离相联系的,相距越远,种群相似程度越低,进一步分析表明种群的分化是与所处生境逐渐旱化相一致的;(3)聚类图上将 7 个种群分为 3 类,PCA 和 PAF 分析通过 3 个成分或因子也将 7 个种群分为 3 类,支持了聚类图的分类结果;(4)特异性位点所占百分比与种群所处生境也有一定的联系,它与环境干燥度的相关系数为 0.76($P < 0.05$)。

关键词:内蒙古草原;克氏针茅;地理种群;遗传分化;RAPD

A RAPD analysis on genetic differentiation of *Stipa krylovii* populations in central and eastern Inner Mongolia Steppe

ZHAO Nian-Xi, GAO Yu-Bao, WANG Jin-Long, CHEN Lei, RUAN Wei-Bin, REN An-Zhi, LIU Hui-Fen (College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3): 560~566.

Abstract: *Stipa krylovii* in Inner Mongolia is a peculiar moderate-temperate steppe of the Central Asia Subzone. Affected by temperate continental climate, the obvious thermal difference due to latitude and the precipitation discrepancy due to monsoons provide the possibility of genetic diversity for *S. krylovii* in the region. Thus it is necessary to make a systematic study of population diversity at the individual, physiological, cellular or molecular levels.

Seven plots, representative of the typical steppe, desert steppe and transition zone respectively, were selected in the belt with the range of 43.6~44.7°N and 113.5~117.8°E in Inner Mongolia. *S. krylovii* samples were collected and the habitats were investigated at the same time. The relationship between the differentiation of *S. krylovii* populations and the change in their habitats (mainly aridity) was studied in this paper to discuss the mechanism of population diversity and offer scientific data and academic basis for the genetic character protection of *S. krylovii*.

The total genomic DNA was isolated from the mixed, dry, leaf material of *S. krylovii* by using the improved SDS protocol and was amplified by RAPD after purification. The reaction mixture contained about 30 ng template DNA in a 25 μ l reaction volume with 2.5 μ l 10 \times reaction buffer, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L each dNTPs, 1 U *Taq* DNA polymerase and 0.2 pmol/L primer. Amplification was performed in a Programmable Thermal Controller—100.7 μ l reaction mixture of each sample

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G2000018601)

收稿日期:2003-03-19; **修订日期:**2003-08-10

作者简介:赵念席(1978~),女,河北辛集人,博士生,主要从事植物种群生态学和种群遗传学研究。E-mail:zhaonianxi@eyou.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: ybgao@nankai.edu.cn

Foundation item: National Key Basic Research Special Foundation Project (No. G2000018601)

Received date: 2003-03-19; **Accepted date:** 2003-08-10

Biography: ZHAO Nian-Xi, Ph.D. candidate, mainly engaged in plant population ecology and genetics research. E-mail: zhaonianxi@eyou.com

was loaded and run on 1.5% agarose gels(containing ethidium bromide)in 1×TBE buffer at 4 V per centimeter, visualized on UV-light and photographed.

The amplified DNA fragments with the size of 400~2000bp were scored by presence (1) or absence (0). All of the data were transferred into a computer and statistical analysis was performed. Jaccard's genetic similarity coefficient, simple matching coefficient (SM) and Dice genetic similarity coefficient were calculated respectively, with which un-weighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster established three DNA molecular dendrograms. Principle component analyses(PCA)and principle axis factoring(PAF) were done to get an overview of the genetic variation in the materials studied.

Twenty-one (21)oligonucleotides screened from 100 decamer primers were selected to analyze the different geographic populations of *S. krylovii*; they yielded profiles with intense and well-separated bands. A total of 229 RAPD markers were produced from the 21 selected primers. The number of total bands for each primer to all samples varied from 8 to 17 with an average of 10.9 bands per primer and the size of the amplified fragments ranged from 400 to 2000bp. Among the total 229 fragments, 171 appeared to be polymorphic(74.67%) with an average of 8.1 for each primer, which illuminated that *S. krylovii* populations had rich polymorphism and distinct genetic difference. Twenty-six (26)unique loci were obtained from RAPD results, which were 11.25% of the total amplified loci. The percentages of unique loci were related to their habitats to a certain extent. Correlative analysis demonstrated that the percentage of unique loci would increase with the increasing aridity ($r=0.76, P<0.05$).

The three dendrograms provided the same results. Seven *S. krylovii* populations were clustered into three groups according to their genetic similarity coefficients. Three populations located in the semi-arid typical steppe belonged to one group; two populations, which lied in the arid desert steppe, were mingled into another group. The remaining populations, whose habitats were between typical steppe and desert steppe, were clustered into the third group. In addition, the results of principle component analyses(PCA)and principle axis factoring(PAF), which are based on band patterns, sustained the results of the dendrograms.

Key words:Inner Mongolia Steppe; *Stipa krylovii* Roshev. ; geographic populations; genetic differentiation; RAPD
文章编号:1000-0933(2004)03-0560-07 中图分类号:Q346 文献标识码:A

内蒙古克氏针茅(*Stipa krylovii*)草原是亚洲中部草原区所特有的中温型草原类型之一。在大针茅(*Stipa grandis*)草原分布区内由于过牧而造成的退化演替地段,克氏针茅可成为优势成分,在荒漠草原区虽有渗入但不形成优势。本区位于欧亚大陆的内陆,温带大陆性气候特点明显,主体部分属于干旱和半干旱气候,南北向纬度变化所造成的热量差异和东西向季风影响所导致的水分差异十分明显^[1,2]。这些都为不同地理种群间克氏针茅产生遗传分化提供极大的可能性。因此,对其不同地理种群在个体、生理、细胞、分子等不同水平上的分化和变异进行系统研究就十分必要了。

近年来随着分子生物学的发展,RAPD 技术已广泛用于植物分子生态学研究领域^[3,4],主要集中在研究分类学上同一属的不同种之间、同一种的不同亚种之间和同一种内不同无性系或群体之间分子的遗传变异,以及这些分子变异与其生境或生态学之间的关系^[5~7],其中对于生态学上重要性状自然变异的研究一直是进化生物学中的热点^[8]。已有研究表明,物种在其分布区内一些重要生态学性状随地理梯度发生变异^[8]。本研究在内蒙古境内纬度 43.6~44.7°N 之间和经度 113.5~117.8°E 之间的一带状范围内,选取 7 个克氏针茅种群,研究它们的变异和分化随这一研究区域以干燥度变化为主的生境变化的关系,以期探讨克氏针茅种群分化的机制,为更好地利用和保护这一种质资源提供科学依据。

1 研究区域与研究方法

1.1 研究区域与研究对象

研究区域位于内蒙古境内 43.6~44.7°N、113.5~117.8°E 之间南北跨度小而东西跨度大的一带状范围内,选取 7 个样地。这 7 个样地所在生境的主要特点见表 1。

本实验在每个样地中用种群取样的方法采集克氏针茅植株叶片。根据种群大小,从每个种群选取的株丛数为 15~30 个(株距>1m),从每个株丛上剪取两新鲜完整叶片形成混合样品,用变色硅胶进行快速干燥固定,带回实验室于室温下保存^[9]。

1.2 实验方法

DNA 提取采用改进的 SDS 法^[10],从硅胶干燥过的克氏针茅叶片混合样中提取 DNA。总 DNA 经 RNase A 处理后,分别在波长 260nm 处测定所提取基因组 DNA 的 OD 值,根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值判断其纯度(纯 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.8^[11])。然后再用 0.7% 的琼脂糖凝胶对其进行电泳,在紫外检测仪上观察其纯度并判别 DNA 分子的大小及一致性。

表 1 克氏针茅种群取样地点的生境特征

Table 1 Habitat characters for the seven populations of <i>Stipa krylovii</i>							
种群编号 Population code	采样地点 Location	地理位置 Geographic position	海拔(m) Altitude	年降水(ml) Annual percipitation	≥10℃ 积温(℃) Accumulated temperature	土壤类型 Soil type	植物群落特征 Character of plant community
A	巴彦乌拉(西乌珠穆沁旗)北 13km	44.64 °N 117.72 °E	1152	340	2256	栗钙土	大针茅-羊草草原。主要伴生种有西伯利亚羽茅、知母,在缓坡的顶部有克氏针茅与大针茅伴生
B	锡林浩特与巴彦乌拉之间	44.31 °N 116.87 °E	1137	340	2256	栗钙土	大针茅-西伯利亚羽茅草原。主要伴生种有无芒雀麦、麻花头、委陵菜,在缓坡家畜践踏严重的地方有克氏针茅分布
C	锡林浩特南中科院草原生态系统定位站附近	43.63 °N 116.70 °E	1425	350	2200	沙质 栗钙土	榆树疏林草原。低平处禾本科植物大针茅、克氏针茅、羊草和糙隐子草多度都较大,还有木地伏、冷蒿和苔草等
D	新浩特(阿巴嘎旗)东 15km	43.99 °N 115.09 °E	1174	250	2400	栗钙土	丛生禾草草原。建群种为糙隐子草,大针茅、羊草、冰草多度较大,冷蒿也比较普遍,在缓坡顶部熔岩台地的边缘,发现克氏针茅与大针茅伴生
E	新浩特到满都拉图(苏尼特左旗)之间	43.92 °N 114.44 °E	1008	230	2448	淡栗钙土	克氏针茅草原。冷蒿多度大,对群落外貌作用明显,地表由于风蚀及放牧导致沙化
F	满都拉图北 20km	43.97 °N 113.62 °E	1027	180	2664	淡栗钙土	原生植被为克氏针茅草原。但由于处于强度放牧干扰下,克氏针茅只有稀疏的株丛分布,多根葱密度较大但根系部分裸露,狭叶锦鸡儿零星分布
G	满都拉图西 15km	43.73 °N 113.53 °E	1026	180	2664	淡栗钙土	狭叶锦鸡儿灌丛化的重度退化克氏针茅草原。群落中有沙葱、多根葱分布,草群低矮,地表裸露严重

随机引物为 Operon 公司生产的 10 个碱基的寡聚核苷酸。

PCR 扩增的总体积为 25μl,在 Programmable Thermal Controller-100 上进行,扩增程序为:94℃ 预变性 4min;94℃ 40s,36℃ 1min,72℃ 2min,共进行 40 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。经 Mg²⁺ 浓度、模板浓度、dNTPs 浓度和引物浓度梯度筛选,选取最佳反应体系为:1μl 模板 (30ng);2μl MgCl₂ (25 mmol/L);2.5μl PCR10×buffer(无 Mg²⁺);0.5μl dNTPs (10 mmol/L);1μl 引物 (5 pmol/L);0.2μl (5 U/μl) Taq DNA 聚合酶和 17.8μl 无菌双蒸水。

1.3 结果处理

扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外投射仪上观察,拍照记录。

以标准分子量标记(鼎国生物生产的 SD005)为对照,由此确定扩增片段的分子量大小。比较同一引物全部个体的扩增结果,具有不同相对迁移距离的条带称作不同的 RAPD 标记,而相对迁移距离相同的条带则为同一个 RAPD 标记。判读每个点样孔的全部扩增结果,RAPD 标记以 1(有)或 0(无)表示,统计分子量为 400~2000bp 的清晰谱带;所得数据输入计算机进行统计分析,根据 Jaccard 法^[12]计算种群间的相似系数(Similarity,*S*),得到种群间遗传相似度矩阵。此外,还采用了 Black 等^[13]针对 RAPD 条带的特点推荐的 Apostol 法(simple matching coefficient,简称 SM)和常用的 Nei & Li 法^[14](所得系数也被称作 Dice 系数^[15])计算得到另外两个遗传相似度矩阵。根据相似度矩阵利用 $D=1-S$ 得到遗传距离(Genetic Distance,*D*)矩阵。用 NTSYS-pc 中的 Shan Clustering 处理矩阵,用 UPGMA 方法^[16]构建分子标记聚类图。

同时,选择 RAPD 的多态条带,用主成分分析(PCA)^[17]和主轴法分析(PAF)^[18]研究各种群的表型数据矩阵,并以此研究各样品间的遗传关系。

2 结果与分析

2.1 克氏针茅种群的 DNA 多态性分析

对 Operon 公司的 100 个 10 核苷酸引物进行筛选,选择能够扩增出清晰、稳定带的引物进行正式扩增,共选择得到 21 个引物,产物的多态性随引物的不同而表现出差异。对这些引物的扩增结果进行统计分析,共扩增得到 229 条 DNA 片段,片段分子量多集中在 400~2000bp 之间(见图 1),其中每个引物扩增条带数在 8~17 之间,平均每个引物扩增出 10.9 条带。在 229 条带中,有 171 条为多态带,多态条带比率(PPB)为 74.67%,平均每个引物 8.1 条多态性带。这表明克氏针茅种群间具有很高的多态性,遗传变异很大。

对各个种群扩增结果的特异性位点(即某种群所特有出现而其它种群没有出现的 DNA 条带)进行统计,结果表明,共有 26 个特异性位点,占总扩增位点数的 11.35%。计算每个种群的特异性位点百分数,由表 2 可以看出,特异性位点百分数与种群所处生境的干燥度有一定的联系,它随着环境干燥度(K)的增大而呈现增加的趋势,相关分析所得相关系数为 0.76($P < 0.05$)。A、B 和 C 种群处于大针茅为主体的较湿润的典型草原区,特异性位点所占比例很小;D 和 E 两个种群占据典型草原生境至荒漠草原的过渡地带,其特异性位点所占比例居中;F 和 G 两个种群地处较干旱的荒漠草原生境,特异性位点所占比例较高。

2.2 克氏针茅种群间的遗传一致度和遗传距离

分别计算基于 Jaccard 系数(S_j)、SM 系数(S_{sm})和 Dice 系数(S_d)的 7 个种群的遗传相似性系数矩阵,由于三者得出的结果及作出的聚类图一致,故仅列出 Jaccard 相似性系数(S_j)和遗传距离($D=1-S_j$)的结果。由表 3 可以看出,克氏针茅种群间的遗传距离从 0.156 到 0.629 不等,平均遗传距离为 0.424;同时还能够看出,F 种群和 G 种群与其他 5 个种群的遗传距离都比较大(0.583~0.629),平均遗传距离为 0.612;这一结果说明克氏针茅种群间存在很高的遗传差异,而主要差异存在于 F、G 两个种群与其他 5 个种群之间。

基于 3 种计算方法得出的遗传相似性系数矩阵,利用 UPGMA 对 3 个相似系数矩阵进行聚类分析,不同种群之间的遗传关系如图 2 所示。对于不同地理来源的克氏针茅种群,由 3 种相似性系数获得了结果相同的聚类图。聚类图上将 A、B 和 C 聚为一类,D 和 E 聚为另一类,F 和 G 聚为第 3 类,最后前两类与第 3 类聚为一大类。这一聚类结果与克氏针茅种群的所在生境有一定的相关性。A、B 和 C 种群处于大针茅为主体的草原,代表一种半干旱的典型草原生境;F 和 G 种群处于狭叶锦鸡儿灌丛化的克氏针茅草原,群落中有沙葱和多根葱,代表一种干旱的荒漠草原生境;D 和 E 种群所在生境是前两种生境类型的过渡类型。

基于扩增结果多态条带类型的主成分分析(PCA)和主轴法分析(PAF)支持上述 UPGMA 聚类的结果。图 3 和图 4 分别显示利用每组分析中提取的前 3 个主成分/主因子得出的 3-D 分布图。图 3 和图 4 将 7 个种群分为 3 组,与聚类所得 3 类严格一致。

3 讨论

本研究表明,克氏针茅不同地理种群间 RAPD 多态位点百分数为 74.67%;不同地理种群间的遗传距离为 0.156~0.629,平均值为 0.424,比马万里等^[19]用同工酶对克氏针茅所得值(<0.16)要高得多,这与 RAPD 检测的标记为植物的整个基因组 DNA 而同工酶仅检测部分性状有关^[20]。大量研究表明,遗传变异越大,物种适应环境的能力就越强^[21],F 和 G 种群与其他种群间的遗传距离很高(平均为 0.61),可见 F、G 种群在长期的自然选择压力下,产生了大量分化而逐步适应干旱环境,从而与其他种群的遗传距离增大。关于环境与变异的研究很多^[22,23],不同研究者得出的结论一致,即如果种群繁殖方式

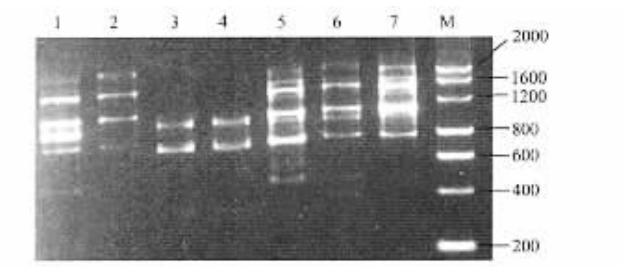


图 1 克氏针茅不同地理种群 RAPD 电泳结果(OPN09)
Fig. 1 RAPD electrophoretogram of primer OPN09 for different geographic populations of *Stipa krylovii*

1=D;2=E;3=G;4=F;5=A;6=B;7=C;A~G:见表 1 see table M 为分子量标记;SD005,分子量大小依次为:2000,1600,1200,800,600,400,200bp

表 2 克氏针茅不同地理种群由 RAPD 分析所得的特异性位点所占比例及其所处生境的干燥度

Table 2 The percentage of unique loci among different geographic populations of *Stipa krylovii* indicated by RAPD data and the aridity of their habitats

种群编号 Population number	总位点数 Total number of loci	特有位点数 Number of unique loci	特有位点百分数 Percentage of unique loci(%)	干燥度(K^*) Aridity
A	146	0	0	1.06
B	138	1	0.72	1.06
C	138	4	2.90	1.01
D	140	3	2.14	1.54
E	142	5	3.52	1.70
F	136	9	6.62	2.37
G	128	4	3.13	2.37

* $K = 0.16 \sum t/r, \sum t$: 10℃以上的积温 Accumulated temperature(℃), r :同期降水量 Precipitation at the same term(mm); A~G:见表 1 see table 1

表 3 克氏针茅不同地理种群 RAPD 分析所得的 Jaccard 相似系数(对角线下方)及遗传距离(对角线上方)

Table 3 The similarity coefficient (below diagonal) and genetic distance (above diagonal) among different geographic populations of *Stipa krylovii* indicated by RAPD data

	A	B	C	D	E	F	G
A	—	0.156	0.225	0.245	0.296	0.583	0.602
B	0.844	—	0.264	0.284	0.323	0.616	0.629
C	0.775	0.736	—	0.294	0.323	0.623	0.629
D	0.755	0.716	0.706	—	0.181	0.613	0.597
E	0.704	0.677	0.677	0.819	—	0.617	0.608
F	0.417	0.384	0.377	0.387	0.383	—	0.192
G	0.398	0.370	0.370	0.403	0.392	0.808	—

A~G:见表 1 see table 1

以营养繁殖或高度近交为主,则其显示出较高的种群间分化。本文所研究的克氏针茅 F 和 G 两种群所处生境经历多年干旱,同时放牧利用压力也很大,使得克氏针茅生殖枝很少或几乎没有,这严重影响了植物的繁殖方式,变为以营养繁殖或高度近交为主,降低重组从而导致种群内的个体更加一致,种群出现分化。

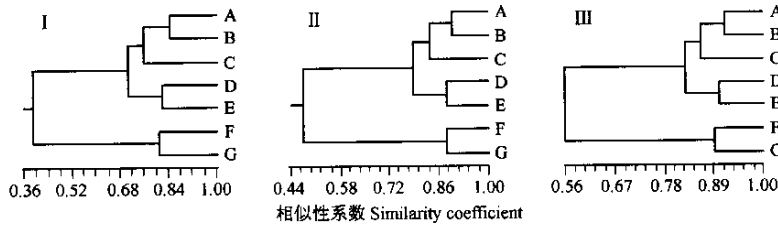


图 2 根据 UPGMA 法对克氏针茅不同地理种群的 RAPD 结果所作的聚类分析

Fig. 2 The agglomerate classification of different geographic populations of *Stipa krylovii* according to RAPD data using UPGMA method
I: 基于 Jaccard 系数所得聚类图 Dendrogram based on Jaccard's similarity coefficients; II: 基于简单匹配系数所得聚类图 Dendrogram based on simple matching coefficients (SM); III: 基于 Dice 系数所得聚类图 Dendrogram based on Dice's similarity coefficients; A~G, 见表 1 see table 1

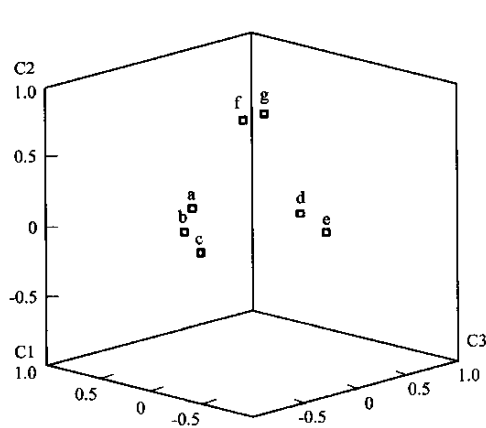


图 3 克氏针茅不同地理种群基于 RAPD 表型的主成分分析(PCA)
Fig. 3 Associations among different geographic populations of *Stipa krylovii* indicated by principal component analyses (PCA)
C1: 成分 1 Component 1; C2: 成分 2 Component 2; C3: 成分 3 Component 3; a~g 同 A~G, 见表 1 the same as A~G, see table 1

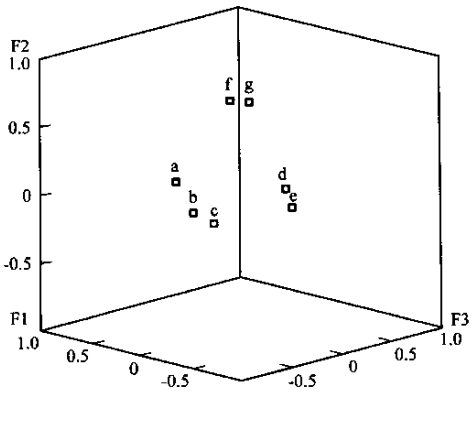


图 4 克氏针茅不同地理种群基于 RAPD 表型的主轴法分析(PAF)
Fig. 4 Associations among different geographic populations of *Stipa krylovii* indicated by principal axis factoring (PAF)
F1: 因子 1 Factor 1; F2: 因子 2 Factor 2; F3: 因子 3 Factor 3; a~g 同 A~G, 见表 1 the same as A~G, See table 1

种群间的遗传距离也是有限度的。由于生境干旱和强度放牧干扰,种群内植株生殖生长受到抑制,与其他种群缺少了有效的基因流动,从而造成种群间遗传分化加大,这对种群的存在会构成威胁。因为如果物种的种群间缺少有效的基因流,随之而来的是遗传漂变,可能导致自交衰退^[24]。F、G 种群间的遗传相似度为 0.808,种群间相似度很大,这与两个种群间自然选择压力趋于一致有很大关系。

聚类图上将 7 个种群分为 3 类,根据野外调查结果可知聚类结果可用种群所处生境来作解释。已有研究表明,物种在其分布区内一些重要的生态学性状随地理梯度发生变异^[24],这种变异和分化是多种生态因子综合作用的结果,并且其中的限制因子随生境发生变化^[25]。对长白山北坡的 4 个长白红景天种群的研究表明该物种对海拔的适应不仅反映在形态变异上,而且有其遗传基础,其遗传变异基本上随海拔的升高而呈上升趋势^[26]。本文的 7 个种群所处纬度基本相同,故初步推测与由东到西的湿润度减少或干燥度增加有关,进一步的证据有待研究。

从聚类图上,可以看出 3 种计算方法得出的结果一致,由此可以排除由于使用不同的计算方法而出现不同的聚类结果的可能。这 3 种计算方法都经常被使用,但不同的研究者使用的并不统一^[9,13]。Nei & Li 法(Dice 系数)计算时需要严格的显、隐性等位基因,有人^[27]认为不能直接应用于显性标记的 RAPD 数据;Jaccard 法计算时只考虑了共有标记(显性),而排除了共同没有的标记(隐性),由于造成共同没有标记的原因比较复杂,排除共同没有的带可能给类群的相似性分析带来误差,因此有人认为

为 S_j 系数并不适合于度量类群间的相似性程度;Apostol 法(simple matching coefficient)除了考虑共有标记,同时也考虑了共无标记,因为相同的隐性基因也是两者的共同之处,但某一标记的共无并不意味着两者绝对是相同的隐性基因,也可能是两个不同的基因,尤其是对亲缘关系较远的物种,问题就变得很严重。本研究所得 3 组遗传系数,存在 $S_j < S_{sm} < S_C$ 的关系, S_j 和 S_C 之间差别较大,但就本实验的聚类结果来看,三者所得结果是一致的。

从特异性位点所占比例来看,它随种群所处生境干燥度的增大而呈现增加的趋势(相关系数 $r=0.76, P<0.05$)。由东到西随着降水量的减少,蒸发量的增加,植被由典型草原变为荒漠草原,环境条件逐渐恶化,在自然压力的选择下,产生新的变异并保留下来,从而可以推测这种变异使得荒漠草原分布种群比典型草原分布的种群有更强的适应环境能力。

克氏针茅不同地理种群已经产生了客观存在的遗传分化,这一点为克氏针茅种质资源库的建立提出了问题,即应该选取多少种群和每个种群应保护多少个体才能达到避免遗传侵蚀和杂合度急剧下降?这一问题,在其他物种种质资源的保护方面也已出现^[9]。

References:

- [1] Commission Editorial of Inner Mongolia Flora. *Flora Intramongolia*. Hohhot: Inner Mongolia People's Press, 1994. **5**:195~205.
- [2] Liu Q, Wu X H, Wang J F. The rational utilization of Inner Mogolia Stipa grassland. *Grassland of China*, 1997, (6):49~52.
- [3] Cui J Z, Zu Y G, Nie J C. Genetic differentiation in *Leymus chinese* populations revealed by RAPD markers II. Statistics analysis. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, **22**(7):983~989.
- [4] D'ennequin M L T, Panaud O, Robert. Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. *Heredity*, 1997, **78**:403~409.
- [5] Dawson I K, Chalmers K T, Waugh R, *et al.* Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* population from Israel using RAPD markers. *Molecular Ecology*, 1993, **2**: 151~159.
- [6] Keil M, Griffin A P. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, **89**:442~450.
- [7] Yun R, Wang H X, Hu Z A, *et al.* Genetic differentiation of *Quercus mongolica* and *Q. liaotungensis* based on morphological observation, isozyme and DNA analysis. *Acta Botanica Sinica*, 1998, **40**(11):1040~1046.
- [8] Jonas C S, Geber M A. Variation among populations of *Clarkia unguiculata* (onagraceae) along altitudinal and latitudinal gradients. *Am. J. Bot.*, 1999, **86**:333~343.
- [9] Qian W, Ge S, Hong D Y. Assessment of genetic variation of *Oryza granulata* detected by RAPD and ISSRs. *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**(7):741~750.
- [10] Clark, M S. Translated by Gu H Y and Qu L J. *Plant molecular biology-a laboratory manual*. Beijing: China Higher Education Press, 1998.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, eds. Translated by Jin D Y & Li M F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1993.
- [12] Jaccard P. Distribution de la flore alpine dans le Bassin des Dranses *et* dans quelques regions voisines. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 1901, **37**:241~272.
- [13] Black I V W C, Du Teau N M, Puterka G J, *et al.* Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in *aphids* (Homoptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.*, 1992, **82**:151~159.
- [14] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic distance in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1979, **76**:5269~5273.
- [15] Dice L R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 1945, **26**:297~306.
- [16] Sneath P H A, Sokal R R. *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco, 1973. 573.
- [17] Hotelling H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 1933, **24**:417~441.
- [18] Gower J C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, 1966, **53**:325~338.
- [19] Ma W L, Xie X M, Wang Z X, *et al.* Studies on isomyze of the genetic resources of *Stipa krylovii* Roshev. in Inner Mongolia steppe. *Grassland of China*, 1995, (3):12~15.
- [20] Altukhov Y P. The role of balancing selection and overdominance in maintaining allozyme polymorphism. *Genetica*, 1991, **85**:79~90.
- [21] Mei S. **万方数据** of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. *Conservation Biology*, 1996, **10**(3):785~795.

[22] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, *et al.* eds. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland Mass: Sinauer, 1990. 43~36.

[23] Wolff K, Rogstad S H, Schaal B A. Population and species variation of minisatellite DNA in *plantago*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, **87**: 733~740.

[24] Ge S, Hong D Y, Wang H Q, *et al.* Population genetic structure and conservation of an endangered conifer *Cathaga argyrophylla* (Pinaceae). *International Journal of Plant Science*, 1998, **159**: 351~357.

[25] Ren W W, Qian J, Zheng S Z. A comparative study on genetic differentiation of *Leymus chinensis* in different geographic populations. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, **19**(5): 689~696.

[26] Yan T F, Yan X F, Zhou F J, *et al.* Research on the distribution and differentiation of RAPD polymorphic fragments for *Rhodiola sachalinensis*. In: Zu Y G, Sun M, Kang L eds. *Theory, method and application of Molecular ecology*. Beijing: China Higher Education Press and Springer - Verlag Heidelberg, 1999. 167~176.

参考文献:

[1] 内蒙古植物志编写委员会. 内蒙古植物志. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1994, **5**: 195~205.

[2] 刘起, 吴新宏, 王建峰. 内蒙古针茅草原的合理利用. 中国草地, 1997, (6): 49~52.

[3] 崔继哲, 祖元刚, 聂江城. 羊草种群遗传分化的 RAPD 分析 II. RAPD 数据的统计分析. 生态学报, 2002, **22**(7): 983~989.

[7] 恽锐, 王洪新, 胡志昂, 等. 北京东灵山辽东栎种群 DNA 多样性的研究. 植物学报, 1998, **40**(11): 1040~1046.

[9] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性. 植物学报, 2000, **42**(7): 741~750.

[10] 顾红雅, 瞿礼嘉译. 植物分子生物学——实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1998.

[11] 金冬雁, 黎明枫译. 分子克隆——实验手册. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993.

[19] 马万里, 解新明, 王振兴, 等. 内蒙古草原克氏针茅 (*Stipa krylovii* Roshev.) 遗传资源的同工酶研究. 中国草地, 1995, (3): 12~15.

[25] 任文伟, 钱吉, 郑师章. 不同地理种群羊草的遗传分化研究. 生态学报, 1999, **19**(5): 689~696.

[26] 颜廷芬, 阎秀锋, 周福军, 等. 长白红景天的分布和 RAPD 多态性片段分化的研究. 见: 祖元刚, 孙梅, 康乐编. 分子生物学原理、方法和应用. 北京: 高等教育出版社-施普林格出版社, 1999. 167~176.

